



PCT/JPC3/14760

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

19.11.03

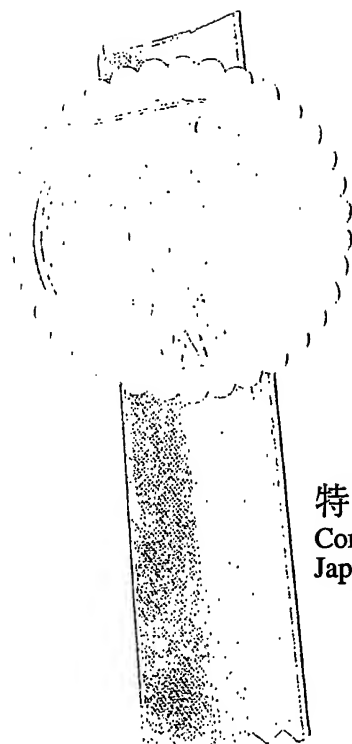
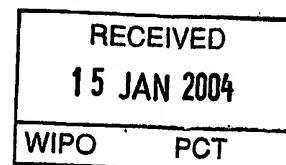
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年   4 月 1 8 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 1 1 3 5 7 8  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 3 - 1 1 3 5 7 8 ]

出 願 人            齋 藤   泉  
Applicant(s):       住 友 製 薬 株 式 有 限 公 司

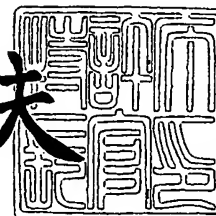


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 2 月 2 6 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出 証 番 号    出 証 特 2 0 0 3 - 3 1 0 7 7 3 4



【書類名】 特許願

【整理番号】 133112

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 07/00  
C12N 15/00

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都港区白金台 4 - 2 - 1 0 - 1 0 0 1

    【氏名】 斎藤 泉

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都港区白金台 4 - 2 - 1 0 - 1 0 0 1

    【氏名】 斎藤 裕美

【特許出願人】

    【識別番号】 502415124

    【氏名又は名称】 斎藤 泉

【特許出願人】

    【識別番号】 000183370

    【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100121588

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 五十部 穰

    【電話番号】 06-6466-5214

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 056546

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1



【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0205876

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規コスミドベクター

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の (1) ~ (3) の特徴を有するコスミドベクター；

(1) 完全な塩基配列のアデノウイルス逆方向反復配列を含むアデノウイルスゲノムを含有する、

(2) アデノウイルス E1 遺伝子領域を欠失している、

(3) アデノウイルスゲノムの両側に該アデノウイルスゲノム中には存在しない制限酵素認識配列を有する。

【請求項 2】 アデノウイルスゲノム以外に、薬剤耐性遺伝子、複製オリジン、スペーサー配列、および COS 領域を含有することを特徴とする、請求項 1 記載のコスミドベクター。

【請求項 3】 薬剤耐性遺伝子および複製オリジンが、アデノウイルスゲノムの左端逆方向反復配列とスペーサー配列との間に位置することを特徴とする、請求項 2 記載のコスミドベクター。

【請求項 4】 アデノウイルスゲノムの左端逆方向反復配列の外側から右端逆方向反復配列に向け、薬剤耐性遺伝子、複製オリジン、スペーサー配列、および COS 領域をこの順序で含有することを特徴とする、請求項 3 記載のコスミドベクター。

【請求項 5】 アデノウイルスゲノムの両側に存在する制限酵素認識配列が TTCGAA である、請求項 1 ~ 4 いずれか記載のコスミドベクター。

【請求項 6】 制限酵素が Csp45 I、BspT104 I または BstBI である、請求項 5 記載のコスミドベクター。

【請求項 7】 E1 遺伝子領域欠失部位に外来遺伝子を挿入するための制限酵素認識配列を有する、請求項 1 ~ 6 いずれか記載のコスミドベクター。

【請求項 8】 制限酵素が Sma I である請求項 7 記載のコスミドベクター。

【請求項 9】 E1 遺伝子領域欠失部位にさらに CAG プロモーターまたは EF-1  $\alpha$  プロモーターを含有する、請求項 7 または 8 記載のコスミドベクター。



【請求項10】 請求項1～9いずれか記載のコスミドベクターを制限酵素で消化し、該コスミドベクターで細胞を形質転換することを特徴とする組換えアデノウイルスベクターの作製方法。

【請求項11】 制限酵素がCsp45 I、BspT104 IまたはBstBIである、請求項10記載の組換えアデノウイルスベクターの作製方法。

【請求項12】 請求項1～9いずれか記載のコスミドベクターを成分として含有する、組換えアデノウイルスベクター作製用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規コスミドベクターに関する。さらに詳しくは、本発明は、組換えアデノウイルスベクターの作製に有効に用いられる新規コスミドベクターに関する。

【0002】

【従来の技術】

組換えアデノウイルスは遺伝子治療のみならず基礎分野での遺伝子機能解析などにも有用性が認められることから、広く利用され始めている。第一世代アデノウイルスベクターの作製法としては、ウイルスゲノム全長を二つのプラスミドに分けてクローン化し、片方のプラスミドのE1遺伝子欠失部位に目的遺伝子の発現単位を組み込み、ゲノム配列が一部重複するもう一方のプラスミドとの相同組換えにより組換えアデノウイルスベクターを得るGrahamらの作製法（非特許文献1を参照）、最近キット化された目的遺伝子の発現単位をクローン化された全長ウイルスゲノムに組み込むクローン化ゲノム導入法（特許文献1、非特許文献2、3および4を参照）、そして我々の開発した末端蛋白付きウイルスゲノムを用いるCOS-TPC法（特許文献2および非特許文献5を参照）が知られている。

【0003】

クローン化ゲノム導入法の原理は約20年前から知られており、作製法は簡便であるもののウイルス生成効率が劣るため実用的な方法とは考えられていなかった

。我々の開発したCOS-TPC法は、ウイルスゲノムのほぼ全長をクローン化したコスミドベクターとEcoT22 Iなどの制限酵素で切断した末端蛋白付きウイルスゲノムDNA (DNA-TPC) との相同組換えの原理に基づいており、高効率に目的組換えウイルスを得ることができる。そのため、細胞への影響を有することが想定される目的遺伝子を発現するベクターの作製例も多数報告されており、非常に有用であると考えられてきた。しかし、生成効率がやや低くとも目的の組換えアデノウイルスベクターが作製できる場合にまで、煩雑なCOS-TPC法を用いる必要性は無い。この観点から簡便なクローン化ゲノム導入法が見直されている。しかしながらこれまでCOS-TPC法に用いてきたコスミドベクターは、アデノウイルスゲノムの両端に欠失部分が存在するため、ウイルスゲノム部分を切り出し直鎖化して細胞を形質転換してもウイルスの生成は不可能である。そのため、より作製法の応用範囲を広げるために、COS-TPC法、完全長クローン化ゲノム導入法の両方に応用可能であり（図1参照）、かつ簡便で実用性の高いコスミドベクターの作製が望まれている状況にあった。

**【0004】****【特許文献1】**

特開平11-332560号公報

**【特許文献2】**

特開平8-308585号公報

**【非特許文献1】**

Bett, A.J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 91: 8802-8806 (1994)

**【非特許文献2】**

Berkner, K.L. et al., Nuc.Acids Res., 11: 6003-6020 (1983)

**【非特許文献3】**

Mizuguchi, H. et al., Hum.Gene Ther., 10: 2013-2017 (1999)

**【非特許文献4】**

水口裕之ら、実験医学、20: 1799-1804 (2002)

**【非特許文献5】**

Miyake S. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 93: 1320-1324 (1996)

## 【0005】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、組換えアデノウイルスベクターの作製に有効に用いられる新規コスミドベクターを提供することにある。すなわち本発明の目的は、COS-TPC法、完全長クローン化ゲノム導入法の両方に应用可能であり、かつ簡便で実用性の高いコスミドベクターを提供することにある。

## 【0006】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、COS-TPC法に用いられているコスミドベクターに存在していたアデノウイルスゲノム両端の欠失部分を完全長に修復し、さらにその外側にアデノウイルスゲノムを消化しない制限酵素の認識配列（TTCTGAなど）を導入した新規なコスミドベクターが、従来知られているコスミドベクターに比して種々の利点を有し、組換えアデノウイルスベクターの作製において極めて有効に使用出来ることが明らかとなった。本発明は、かかる知見に基づき完成するに至ったものである。

## 【0007】

すなわち本発明は、

- 1) 以下の(1)～(3)の特徴を有するコスミドベクター；
  - (1) 完全な塩基配列のアデノウイルス逆方向反復配列を含むアデノウイルスゲノムを含有する、
  - (2) アデノウイルスE1遺伝子領域を欠失している、
  - (3) アデノウイルスゲノムの両側に該アデノウイルスゲノム中には存在しない制限酵素認識配列を有する、
- 2) アデノウイルスゲノム以外に、薬剤耐性遺伝子、複製オリジン、スペーサー配列、およびCOS領域を含有することを特徴とする、前記1)記載のコスミドベクター、
- 3) 薬剤耐性遺伝子および複製オリジンが、アデノウイルスゲノムの左端逆方向反復配列とスペーサー配列との間に位置することを特徴とする、前記2)記載のコスミドベクター、

- 4) アデノウイルスゲノムの左端逆方向反復配列の外側から右端逆方向反復配列に向け、薬剤耐性遺伝子、複製オリジン、スパーサー配列、およびC O S領域をこの順序で含有することを特徴とする、前記3) 記載のコスミドベクター、
- 5) アデノウイルスゲノムの両側に存在する制限酵素認識配列がT T C G A Aである、前記1) ~ 4) いずれか記載のコスミドベクター、
- 6) 制限酵素がC s p 4 5 I、B s p T 1 0 4 IまたはB s t B Iである、前記5) 記載のコスミドベクター、
- 7) E 1 遺伝子領域欠失部位に外来遺伝子を挿入するための制限酵素認識配列を有する、前記1) ~ 6) いずれか記載のコスミドベクター、
- 8) 制限酵素がS w a Iである前記7) 記載のコスミドベクター、
- 9) E 1 遺伝子領域欠失部位にさらにC A GプロモーターまたはE F - 1  $\alpha$  プロモーターを含有する、前記7) または8) 記載のコスミドベクター、
- 10) 前記1) ~ 9) いずれか記載のコスミドベクターを制限酵素で消化し、該コスミドベクターで細胞を形質転換することを特徴とする組換えアデノウイルスベクターの作製方法、
- 11) 制限酵素がC s p 4 5 I、B s p T 1 0 4 IまたはB s t B Iである、前記10) 記載の組換えアデノウイルスベクターの作製方法、ならびに
- 12) 前記1) ~ 9) いずれか記載のコスミドベクターを成分として含有する、組換えアデノウイルスベクター作製用試薬、に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】

以下に本発明について詳細に説明する。

なお、本明細書ではアデノウイルスゲノムでの遺伝子の位置を示すため、マップ単位 (map units、以後m.u.と略す、1 m.u.は約360塩基対) を使用することがあるが、その値はアデノウイルス5型を基準にしたものを用いている。当該アデノウイルスのゲノム構造は周知であり、例えばヒトアデノウイルス2型ゲノムの全塩基配列はジーンバンク (アクセス番号J01949) に、またヒトアデノウイルス5型ゲノムの全塩基配列はジーンバンク (アクセス番号M73260) に登録されている。よって特に断りがない限り、アデノウイルスにコードされる遺伝子の位置は



アデノウイルス 5 型を例として示すが、本明細書におけるアデノウイルスはこれに限定されるものではない。

#### 【0009】

本発明のコスミドベクターとは、以下の(1)～(3)の特徴を有するものである；

- (1) 完全な塩基配列のアデノウイルス逆方向反復配列を含むアデノウイルスゲノムを含有する、
- (2) アデノウイルス E1 遺伝子領域を欠失している、
- (3) アデノウイルスゲノムの両側に該アデノウイルスゲノム中には存在しない制限酵素認識配列を有する。

#### 【0010】

ここで前記(1)におけるアデノウイルスゲノムとは、アデノウイルス科に属するウイルスが有する直鎖状二本鎖DNAのことを言う。具体的には、ヒトアデノウイルス 2 型ゲノム (ジーンバンク アクセス番号J01949)、ヒトアデノウイルス 5 型ゲノム (ジーンバンク アクセス番号M73260) などが挙げられる。当該アデノウイルスゲノムは、以下に示すように完全な塩基配列のアデノウイルス逆方向反復配列を含有することを要するが、それ以外の領域については、組換えアデノウイルスベクターとしての機能を有することを限度として、当業者の常識の範囲で適宜塩基配列の置換、欠失および／または挿入が施されていても良い。

#### 【0011】

またアデノウイルス逆方向反復配列 (以下、逆方向反復配列のことを ITR と略する) とは、アデノウイルスゲノムの両末端に存在し、互いに逆向きになった反復配列のことで、その塩基数はアデノウイルスの血清型により異なるが、ヒトアデノウイルス 5 型においては 103 塩基、2 型では 102 塩基である。

よって「完全な塩基配列のアデノウイルス ITR を含むアデノウイルスゲノム」とは、それぞれの血清型のアデノウイルスに本来存在する ITR 部分の塩基配列を完全に含むアデノウイルスゲノムを意味する。

#### 【0012】

前記(2)においてアデノウイルス E1 遺伝子領域とは、1.3 - 4.6 m.u. に位置する E1A 遺伝子領域と 4.6 - 11.2 m.u. に位置する E1B 遺伝子領域の総称である。E1

遺伝子領域には、アデノウイルスの複製ならびに遺伝子発現に必須のタンパク質がコードされている。

アデノウイルスE1遺伝子領域を欠失しているとは、E1遺伝子領域の全部もしくは一部の塩基配列が存在しないことであり、E1遺伝子領域にコードされるタンパク質が産生されない、あるいは産生されても機能しないような欠失であれば、欠失する範囲に特に制限はない。E1遺伝子領域の欠失の例として、1.3 - 9.3 m.u. の欠失 (Trapnell B. C., Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 12, 185-199 . (1993) Elsevier Science Publishers B. V. ) が挙げられる。

#### 【0013】

前記(3)においてアデノウイルスゲノムの両側とは、プラスミドベクターやコスミドベクターにクローニングされたアデノウイルスゲノムを挟む位置のことを言う。具体的には、左端ITR側においてはアデノウイルスパッケージングシグナルとは逆側の位置、右端ITR側においてはE4遺伝子プロモーターとは逆側の位置のことである。

#### 【0014】

ここで、アデノウイルスゲノムの両側に存在する制限酵素認識配列は、当該アデノウイルスゲノム中に存在しない制限酵素認識配列であれば如何なる配列であっても良いが、望ましくは6塩基認識の制限酵素の認識配列、さらに望ましくは制限酵素 Csp45 I、BspT104 IおよびBstB Iの認識配列である TTCGAAを挙げることができる。

#### 【0015】

本発明のコスミドベクターにおけるアデノウイルスゲノム部分は、E1遺伝子領域以外の遺伝子がさらに欠失していても良いし、また塩基配列の一部に置換や挿入があっても良い。E1遺伝子領域以外の遺伝子の欠失の例として、E3遺伝子領域、pIX遺伝子、E4遺伝子領域、若しくはE2A遺伝子などの欠失が挙げられる。ここで欠失とは、前記いずれかの遺伝子(領域)において全部もしくは一部の塩基配列が存在しないことであり、当該遺伝子(領域)にコードされるタンパク質が産生されない、あるいは産生されても機能しないような欠失であれば、欠失する範囲に特に制限はない。

## 【0016】

また、cDNAやプロモーターなどの外来遺伝子が挿入できるように、アデノウイルスゲノム中に存在しない制限酵素認識配列がE1遺伝子領域欠失部位に存在することが好ましい。当該制限酵素認識配列としては、平滑末端を生じさせる制限酵素認識配列であることが好ましく、具体的には *Swa* I 認識配列 (ATTTAAT) が挙げられる。平滑末端を生じさせる制限酵素により認識される配列が好ましいのは、一つには外来遺伝子を含むインサート断片を当該コスミドベクターに組み込む際、インサート断片を平滑末端化するだけで直接組み込めるため、シャトルプラスミドを用いる必要が無いからである。もう一つには、当該コスミドベクターとインサート断片とをライゲーションした後に当該制限酵素 (*Swa*I等) で消化することにより、インサート断片が挿入されていないコスミドクローンが除かれるため、インサートが挿入された所望のコスミドクローンが効率的に得られるからである。

## 【0017】

前記E1遺伝子領域欠失部位は、さらに、外来遺伝子を発現させるプロモーターを含有していても良い。ここでプロモーターとは、所望の外来遺伝子の転写を行うために必要な塩基配列のことを言い、哺乳動物の細胞で機能するプロモーターであれば、動物ウイルス由来プロモーターや哺乳動物細胞由来プロモーター、または両者のハイブリッドプロモーターなど、特に制限なく用いることができる。プロモーターの例として、CAGプロモーター、EF-1 $\alpha$ プロモーター、CMVプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、RSVプロモーターなどが挙げられるが、CAGプロモーター (Niwa H. et. Al., Gene, Vol. 108, 193-200. (1991)) やEF-1 $\alpha$ プロモーター (Kim D.W. et. al. Gene, Vol. 91, 217-223. (1990)) ならびにCMVプロモーター (Foecking M. K. et. al. Gene, Vol. 45, 101-105. (1986)) など特に高発現とされているプロモーターを用いるのが好ましい。

## 【0018】

本発明のコスミドベクターはアデノウイルスゲノム以外に、少なくとも、薬剤耐性遺伝子、複製オリジン、スパーサー配列、およびCOS領域を含有する。ここで薬剤耐性遺伝子とは、大腸菌に対して毒性を有する薬剤に対して耐性を賦与す

る遺伝子を言い、その例としてアンピシリン耐性遺伝子やカナマイシン耐性遺伝子などが挙げられる。また複製オリジンとは、大腸菌におけるプラスミドの複製起点のことを言う。

#### 【0019】

スペーサー配列とは、それ自体は機能を有さないが、コスミドベクター全体のサイズを調節するための塩基配列を言う。その目的は、スペーサー配列を挿入しコスミドベクター全体のサイズを一定以上の大きさにすることにより、コスミドベクターのin vitroでのパッケージング効率を上げるためである。当該スペーサー配列としては、具体的にはプラスミドpBR322由来の約2 kbのDNA断片 (Saito I. et. Al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 83, 8664 - 8668. (1986)) が挙げられ、当該スペーサー配列が3個タンデムに並んでいるものを用いることが好ましい。

#### 【0020】

COS領域とは、バクテリオファージλの粘着末端が連結した塩基配列のことを言う。なお、薬剤耐性遺伝子、複製オリジン、およびCOS領域に関しては、Molecular Cloning, A Laboratory Manual., T.Maniatis ら編、第2版 (1989)、Cold Spring Harbor Laboratory 等の基本書に明確に定義されているので、それらを参照されたい。

#### 【0021】

本発明のコスミドベクターにおいて、薬剤耐性遺伝子および複製オリジンは、アデノウイルスゲノムの左端ITRとスペーサー配列との間に位置することが望ましい。すなわち、薬剤耐性遺伝子および複製オリジンが、アデノウイルスゲノムの左端ITRとスペーサー配列との間に位置することにより、本発明のコスミドベクターに所望の外来遺伝子を挿入した後、外来遺伝子の挿入部位はコスミドベクターと全く同じ塩基配列を保持したまま、アデノウイルスゲノムの大部分及び、スペーサー領域ならびにCOS領域を除いたプラスミドを容易に作製することができる (アデノ落とし)。

なお、この操作を簡便に行うため、E1遺伝子領域の左側 (ITR/パッケージングシグナル側) から薬剤耐性遺伝子ならびに複製オリジンまでの間には存在しな

い制限酵素認識部位を、E1遺伝子領域の外来遺伝子挿入部位の右側（IVa2遺伝子側）に付加しておくことが望ましい。そのような制限酵素の例として、前述したpBR322由来のスペーサー配列内にも認識配列が存在するSalIやNruIが挙げられる。

#### 【0022】

前記薬剤耐性遺伝子および複製オリジンは、アデノウイルスゲノムの左端ITRの外側から右端ITRに向け、薬剤耐性遺伝子、複製オリジンの順序で含有されていても良いし、また複製オリジン、薬剤耐性遺伝子の順序で含有されていても良い。従って薬剤耐性遺伝子、複製オリジン、スペーサー配列およびCOS領域が、アデノウイルスゲノムの左端ITRの外側から右端ITRに向けてどのような順序で含有されるかについては、以下の①～④が例示される：

- ①薬剤耐性遺伝子、複製オリジン、スペーサー配列、COS領域。
- ②複製オリジン、薬剤耐性遺伝子、スペーサー配列、COS領域。
- ③薬剤耐性遺伝子、複製オリジン、COS領域、スペーサー配列。
- ④複製オリジン、薬剤耐性遺伝子、COS領域、スペーサー配列。

このうち特に、薬剤耐性遺伝子、複製オリジン、スペーサー配列およびCOS領域をこの順序で含有するコスミドベクターが好ましい。

#### 【0023】

次に、本発明のコスミドベクターの作製法を以下に例示する。

本発明のコスミドベクターは、アデノウイルスゲノムの大部分がクローニングされたコスミドベクターから作製できる。その例を以下に示す。コスミドベクターpAxcw（特開平8-308585号公報、15頁、pAdexlcwはpAxcwと同一である）は、E1およびE3遺伝子領域以外のヒトアデノウイルス5型ゲノムの大部分を含むが、左端から33bpと右端から198bpを欠失したベクターである（図3の(A)）。まず、コスミドベクターpAxcwをSalI消化後自己ライゲーションすることにより、アデノウイルスゲノムの大部分を除き、E1遺伝子領域欠失部位から左側（ITR／パッケージングシグナル側）約430bpを含むプラスミド（pxcws、図3(B)）を作製する。プラスミドpxcwsで欠失しているアデノウイルスゲノム左端部分は、ゲノム左端から33bpのみであるので、欠失部位の塩基配列を有するオリゴDNAを合

成し、欠失部位に挿入することで修復され、左端が完全なゲノム配列を持つプラスミドを作ることができる。なお、その際合成DNAのアデノウイルスゲノム左端に隣接して所望の制限酵素に認識配列を付加しておくことにより、アデノウイルスゲノム内には認識部位が存在しない制限酵素の認識配列をゲノム左端の挿入することができる。このようにして作製したプラスミドpyctcws (図3(D))は完全長の左端ITRおよびITRに隣接してCsp45I部位を持つプラスミドである。pyctcwsのEcoRI-SwaI間を、コスミドベクターpAxcwのEcoRI-SwaI間と置換することにより、ゲノム左端が完全長に修復されたコスミドベクターpAxcwith (図4(E))が得られる。

#### 【0024】

ゲノム右端からの198bpの欠失の修復は、左端と同様に欠失部位の塩基配列を複数のオリゴDNAに分けて合成し、ゲノム右端部分を一旦クローニングしたプラスミドにこれらを合成DNAを挿入することでも実施可能である。しかし、本明細書では、左端ITRと右端ITRの塩基配列は同一であることを利用して右端の欠失部位の修復を行う方法について説明する。まず、アデノウイルス5型ゲノムの76マップ単位のEcoRI部位からゲノム右端付近までを含むプラスミドpdlx (Saito I. et. al., J. Virol., Vol.54, 711-719. (1985))のゲノム右端から約1kbを含むHindIII-BamHI断片をサブクローニングする(プラスミドpUAF97R、図4(F))。このプラスミドpUAF97RのHhaI-BamHI間を、プラスミドpyctcwsのHhaI-BamHI間(83bp)と置換することにより、完全長の右端を有するプラスミドpUAF97Rct (図4(G))が得られる。最後に、コスミドベクターpAxcwithのゲノム右側部分をプラスミドpUAF97Rctのゲノム右側部分とを順次入れ替えることにより、両端とも完全長に修復されたコスミドベクターpAxcwit (図5(K))を作製することができる。

#### 【0025】

本発明のコスミドベクターは、従来知られているコスミドベクターに比して、以下の(1)～(5)に示すように種々の利点・特徴を有し、組換えアデノウイルスベクターの作製において極めて有効に使用することができる。

#### 【0026】



(1)本発明のコスミドベクターは、完全長クローン化ゲノム導入法、COS-TPC法のいずれの方法においても高い効率でアデノウイルスベクターを作製することが出来る(図1)。特に、クローン化ゲノム導入法は従来よりウイルス生成効率が低いことが問題点として指摘されていたが、本発明のコスミドベクターを用いることにより十分なウイルス生成効率を確保することができる。

具体的なアデノウイルスベクターの作製ステップとしては、まず、外来遺伝子(目的遺伝子)を挿入した本発明のコスミドベクターを用いてクローン化ゲノム導入法により組換えアデノウイルスを作製する(図1(B))。ベクターに搭載した外来遺伝子の発現が宿主細胞に毒性を示すなどの理由により、この方法で目的アデノウイルスが得られにくい場合や、ウイルスゲノムを切り出すための制限酵素部位が外来遺伝子内に存在する場合は、そのまま従来のCOS-TPC法(特開平8-308585号公報)のコスミドカセット(コスミドベクター)として用いて組換えアデノウイルスを取得することができる(図1(A))。このように本発明のコスミドベクターを用いることにより、如何なる外来遺伝子に対しても効率良く組換えアデノウイルスを作製することが出来る。

#### 【0027】

(2)本発明のコスミドベクターをクローン化ゲノム導入法で用いる場合は、親ウイルスDNAを必要としないため廉価で入手することが出来る。また従来法(COS-TPC法)における相同組換えのステップを要さないため、生成した組換えウイルスはほぼ100%目的のウイルスであり、目的ウイルスクロンの選別の手間をほとんどかけることなく目的遺伝子を持つウイルスベクターを簡便に作製することができる。

#### 【0028】

(3)本発明のコスミドベクターが、アデノウイルスゲノムの左端ITRの外側から右端ITRに向け、薬剤耐性遺伝子、複製オリジン、スペーサー配列およびCOS領域をこの順序で含有することにより、本発明のコスミドベクターに所望の外来遺伝子を挿入した後、外来遺伝子の挿入部位はコスミドベクターと全く同じ塩基配列を保持したまま、アデノウイルスゲノムの大部分及び、スペーサー領域ならびにCOS領域を除いたプラスミドを容易に作製することができる(アデノ落とし)とい

う利点を有する。アデノ落としをしたプラスミドを用いることにより、外来遺伝子とベクターとのジャンクション部分を容易にシーグエンズすることができる。さらには、アデノ落としをしたプラスミドで細胞を形質転換することにより、挿入した遺伝子の発現を確認することができる。

#### 【0029】

(4) 本発明のコスミドベクターにおけるE1遺伝子欠失部位に、平滑末端を生じさせる制限酵素（例えばSwa I）の認識配列を有することにより、外来遺伝子を含むインサート断片を当該コスミドベクターに組み込む際、シャトルプラスミドを用いる必要が無く、インサート断片を平滑末端化するだけで直接組み込めるという利点を有する。また、当該コスミドベクターとインサート断片とをライゲーションした後にSwaIで消化することにより、インサート断片が挿入されていないコスミドクローンが除かれるため、インサートが挿入された所望のコスミドクローンが高い頻度で得られるという利点も有する。

#### 【0030】

(5) 本発明のコスミドベクターは、アデノウイルスゲノム両側に該アデノウイルスゲノム中には存在しない制限酵素認識配列を含有する。当該制限酵素がCsp45Iである場合（すなわち制限酵素認識配列がTTCGAAである場合）、細胞を形質転換する前に当該コスミドベクターを制限酵素消化する際に、完全消化が容易であるという利点を有する。通常、本発明のコスミドベクターを制限酵素消化する際、コスミドDNA 30  $\mu$ gを100単位の制限酵素消化する。Csp45IはTOYOBO社から市販されているが、1包装当たり2500単位の酵素が含まれているので、本発明のコスミドベクターを1包装で25回消化することができる。一方、従来のクローン化ゲノム法のプラスミドやコスミドベクターで用いられている制限酵素PacI（認識配列TTAATTAA）も同じくTOYOBO社から市販されているが、1包装当たり50単位しか酵素が含まれておらず、本発明のコスミドベクターを消化するのに2包装が必要である。従って、Csp45IとPacIとでは、同量のコスミドベクターを消化するのに必要な制限酵素の包装量に50倍もの差がある。さらに本発明者らの経験では、1包装当たりに含まれる単位数が少ない制限酵素は、1包装当たりに含まれる単位数が多い制限酵素に較べると、同じ単位数を用いて基質DNAを消化しても



、完全消化が困難であるという傾向があることを見出している。従って、Csp45Iを用いることにより、PacIを用いるよりも必要な制限酵素量がさらに少なくて済み、かつ完全消化が容易であるという利点を有する。

#### 【0031】

本発明はまた、本発明のコスミドベクターを用いた組換えアデノウイルスベクターの作製方法を提供する。本発明の組換えアデノウイルスベクターの作製方法は、以下の工程(1)及び(2)を含有する；

- (1)本発明のコスミドベクターを制限酵素で消化する工程、
- (2)前記(1)工程で制限酵素消化したコスミドベクターで細胞を形質転換する工程。

#### 【0032】

工程(1)において用いる制限酵素は、アデノウイルスゲノム内には認識配列が存在せず、アデノウイルスゲノムの両側に存在する制限酵素認識配列を消化することの可能な制限酵素である。好ましくはTTCGAAを認識する制限酵素である Csp 45 I、BspT104 Iまたは BstB Iが挙げられる。

工程(2)において用いる細胞は、アデノウイルスE1遺伝子を発現し、アデノウイルスを増殖させることに適した細胞であれば特に制限はない。そのような細胞の例として、ヒト胎児腎臓由来細胞株293細胞(ATCC CRL1573)が挙げられる。

#### 【0033】

次に本発明の組換えアデノウイルスベクターの作製方法を以下に記載する。

まず、本発明のコスミドベクターを用いて、293細胞などの細胞を形質転換する。細胞を形質転換する方法に特に制限は無く、リン酸カルシウム共沈殿法、リポフェクション法、DEAE-dextran法、エレクトロポレーション法など既存の方法を用いることができる。形質転換した細胞を培養することにより、組換えアデノウイルスベクターが生成するが、生成したウイルスはクローニングすることが望ましい。クローニングの方法に特に制限は無く、生成したウイルスの増殖により出現したプラークを単離する方法や、形質転換した細胞をあらかじめ、限界希釈して96穴プレート等にまき替える方法がある。生成したウイルスは、そのほとんどが目的のウイルスクローンであるので、任意のクローンを選び目的ウイルスと

して用いることもできるが、ウイルスゲノムの制限酵素消化解析を行い、目的ウイルスの構造をしていることを確認したクローンを用いる方が望ましい。

本発明のコスミドベクターはまた、従来のCOS-TPC法のコスミドカセット（コスミドベクター）として、組換えアデノウイルスベクターの作製に用いることができる。この場合、前記工程(1)のコスミドベクターを制限酵素で消化する工程は不要である。

#### 【0034】

本発明はまた、本発明のコスミドベクターを成分として含有する、組換えアデノウイルスベクター作製用試薬を提供する。本発明の試薬は、水または適当な緩衝液にコスミドベクターを溶解した形で提供される。当該緩衝液は、DNAを溶解、保持するのに適した緩衝液であれば特に制限は無いが、TEバッファーを用いることが望ましい。

また前記試薬においては、本発明のコスミドベクターを環状のまま提供しても良いし、あらかじめSwaIなどの制限酵素で消化したコスミドベクターとして提供しても良い。

#### 【0035】

本発明の試薬は、組換えアデノウイルス作製のキットの一成分とすることができる。当該キット中の他の成分としては、組換えアデノウイルスを作製するために必須となる種々の試薬を挙げることができる。具体的には、制限酵素、制限酵素反応用バッファー、DNAリガーゼ、リガーゼ反応用バッファー、制限酵素消化済み末端タンパク質付きアデノウイルスゲノムDNA（DNA-TPC）等を挙げることができる。前記制限酵素としては、①アデノウイルスゲノムの両側に存在する制限酵素認識配列を消化する制限酵素（例えばCsp45 I、BspT104 IまたはBstB I）、および/または ②E1遺伝子欠失部位に存在する制限酵素認識配列を消化する制限酵素（例えばSwa I）を挙げることができる。制限酵素消化済みDNA-TPCの例として、アデノウイルスAd5-dIX（Miyake S. et. Al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, 1320-1324. (1996)）のゲノムDNAをEcoE22I消化したDNA-TPCや、組換えアデノウイルスAxCAwt（Kanegae Y. et. al., Nucleic acid Res., Vol. 23, 3816-3821 (1995)）のゲノムDNAをEcoE22I及びClaI消化したDNA-TPC等が挙げ

られる。

### 【0036】

#### 【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではなく、本発明の技術分野における通常の変更ができることは言うまでもない。なお、実施例中のファージ、プラスミド、DNA、各種酵素、大腸菌、培養細胞等を取り扱う諸操作は、特に断らない限り、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual, T. Maniatis ら編、第2版 (1989), Cold Spring Harbor Laboratory」に記載の方法に準じて行った。

### 【0037】

#### 実施例 1

—アデノウイルスゲノム両端を完全長にしたコスミドベクターの作製—

①pAxcw (特開平8-308585号公報15頁のpAdexlcwはpAxcwと同一である) は、ヒトアデノウイルス 5 型ゲノムの大部分を含むが、E 1 および E 3 遺伝子領域ならびにアデノウイルスゲノムの左端から33bpと右端から198bpを欠失した (両端欠失型) コスミドベクターである (図 2 A 及び図 3 (A) 参照)。pAxcwをSalI消化後、自己ライゲーションし、アデノウイルスゲノム左端から約0.4kbの部分以外のアデノウイルスゲノムを除いたプラスミドpxcws (3.1kb、図 3 (B)) を作製した。

### 【0038】

②完全長の左端ITRを含むプラスミドを作製するため、以下の操作を行った。

(a) プラスミドpxcwsをBamHI及びBsrGI消化し、oriを含む約2.9kbのDNA断片を得た。

(b) プラスミドpxcwsをHaeIII及びBsrGI消化し、ITRを含む162bpのDNA断片(b)を得た。

(c) アデノウイルス 5 型ゲノム左端部分を含み、かつアニーリングした時に、片方の末端がBamHI消化断片と結合可能で、他方が平滑末端になるように設計した以下の2つのオリゴDNAを合成し、その5'末端をリン酸化後アニーリングしたDNA断片を得た。

5'-gatccgcatgCATCATCAATAATATACCTTATTTTGGATTGAAG-3' (配列番号 1)

5'-CTTCAATCCAAAATAAGGTATATTATTCATGATGcatgcg-3' (配列番号 2)

(大文字はアデノウイルスゲノム部分の塩基配列を表す)

(a)(b)(c)の三断片をライゲーションし、完全長の左端ITRを含むプラスミドpytcw (3.1kb、図3(C))を作製した。

#### 【0039】

③プラスミドpytcwにCsp45I部位を導入するため、以下の操作を行った。プラスミドpytcwをEcoT22Iで消化後、Klenow酵素で3'突出末端を平滑化した。このDNA断片と、Csp45I認識配列を含みかつ5'末端をリン酸化した合成リンカー (5'-TGTTCGAACA-3') をライゲーションし、リンカーが一つのみ挿入されたプラスミドpyctcws (3.1kb、図3(D))を得た。

#### 【0040】

④プラスミドpyctcwsをSwaI及びEcoRI消化し、完全長左端ITR及びパッケージングシグナルを含む482bpのDNA断片(a)を調製した。一方、コスミドベクターpAxcwをEcoRI消化し、ori及びCOS領域を含む約18kbのDNA断片(b)を調製した。また、pAxcwをSwaI及びEcoRI消化し、COS領域を含まない側の約24kbのDNA断片(c)を調製した。(a)(b)(c)の三断片をライゲーションし、コスミドベクターpAxcwith (42.5kb、図4(E))を得た。pAxcwithは、ゲノム右端側はITRを含む198bpを欠失しているものの、左端ITRは完全長であるコスミドベクターである。

#### 【0041】

⑤プラスミドpdlxは、アデノウイルス5型ゲノムの76マップ単位のEcoRI部位からゲノム右端付近までを含むプラスミドである (Saito I. et. al., J. Virol., Vol.54, 711-719. (1985))。pdlxをHindIII及びBamHI消化し、アデノウイルスゲノム右端側を含む約1kbのDNA断片を調製した。このDNA断片をプラスミドpUC19のマルチクローニングサイト内のHindIII-BamHI部位間に挿入し、プラスミドpUAF97R (3.7kb、図4(F))を得た。

#### 【0042】

⑥プラスミドpUAF97RをBamHI及びAor51HI消化し、oriを含む約3.3kbのDNA断片(a)を調製した。また、pUAF97RをAor51HI及びHhaI消化し、oriを含まない375bpのD

NA断片(b)を調製した。一方、②で作製したプラスミドp<sub>pyctcws</sub>をBamHI及びHhaI消化し、ITRの一部を含む83bpのDNA断片(c)を調製した。(a)(b)(c)の三断片をライゲーションし、プラスミドpUAF97Rct(3.7kb、図4(G))を得た。

#### 【0043】

⑦プラスミドpUAF97RctをのBstEII-BamHI部位間の713bpの領域を、プラスミドp<sub>dlx</sub>のBstEII-BamHI部位間と入れ替え、プラスミドp<sub>dlxct</sub>(9.0kb、図5(H))を作製した。p<sub>dlxct</sub>は完全長右端ITRを有するプラスミドである。

#### 【0044】

⑧コスミドベクターpAx4w(図5(I))は、アデノウイルスE4遺伝子の上流と右端ITRとの間に外来遺伝子の挿入部位を有するベクターである(Miyake S. et. Al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, 1320-1324. (1996))。pAx4wをEcoRI及びBamHI消化し、ori及びCOS領域を含む約11kbのDNA断片を得た。一方、プラスミドp<sub>dlxct</sub>をEcoRI及びBamHI消化し、oriを含まない6.7kbのDNA断片を得た。両断片をライゲーションし、プラスミドp<sub>cdlxct</sub>(18.1kb、図5(J))を得た。

⑨コスミドベクターpAxcwith(④で作製)をEcoRI消化し、左端ITRを含む約24.6kbのDNA断片を調製した。このDNA断片をプラスミドp<sub>cdlxct</sub>のEcoRI部位に挿入し、コスミドベクターpAxcwit(42.6kb、図5(K))を作製した。pAxcwitは、左端ITRおよび右端ITRとも完全長であるコスミドベクターである。

#### 【0045】

##### 実施例2

##### ー発現単位を挿入したコスミドベクターの作製ー

##### (1) サンゴ由来赤色蛍光タンパク質の発現単位を挿入したコスミドベクターの作製

コスミドベクターpAxCAwt(図6(A))は、pAxcwと同じアデノウイルスゲノム構造を有し(両端欠失型)、かつE1遺伝子欠失部位にCAGプロモーター(Niwa H. et. Al., Gene, Vol. 108, 193-200. (1991)および日本特許第2824434号)が左向き(E1遺伝子の転写方向の逆向き)に挿入されたベクターである(Kanegae Y. et. al., Nucleic acid Res., Vol.23, 3816-3821 (1995))。pAxCAwtには、CAGプロモーターとポリA付加配列との間に外来遺伝子を挿入するためSwaI部位が存在

する。

#### 【0046】

サンゴ由来赤色蛍光タンパク質 (RedE) をコードする遺伝子は、市販プラスミド pCMV-DsRed-Express (クローンテック社) より調製した。pCMV-DsRed-Express を NotI 及び Aor51HI 消化後、Klenow 酵素で両端を平滑化し、RedE 遺伝子を含む 713 bp の DNA 断片を調製した。この DNA 断片を pAxCAwt の SmaI 部位に挿入し、RedE 発現単位が挿入されたコスミドベクター pAxCARedE (45.5kb、両端欠失型、図 2 A 参照) を作製した。

次いで、pAxCARedE を SalI 及び PmeI 消化後、Klenow 酵素で平滑化し、RedE 発現単位を含む約 3kb の DNA 断片を調製し、実施例 1 で作製したコスミドベクター pAxcwith の SmaI 部位に挿入し、コスミドベクター pAxCARedEith (45.5kb、左端完全型、図 2 B 参照) を作製した。同様に、RedE 発現単位を含む DNA 断片をコスミドベクター pAxcwit の SmaI 部位に挿入し、コスミドベクター pAxCARedEit (45.5kb、両端完全型、図 2 C 参照) を作製した。

#### 【0047】

#### (2) クラゲ由来緑色蛍光タンパク質の発現単位を挿入したコスミドベクターの作製

プラスミド p<sub>px</sub>CAEGFP は、CAG プロモーターの下流にクラゲ由来緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子が連結されたベクターである (Nakano M. et. al., Nucleic acid Res., Vol.29, e40 (2001))。p<sub>px</sub>CAEGFP を SalI 及び PmeI 消化後、Klenow 酵素で平滑化し、GFP 発現単位を含む約 3.1kb の DNA 断片を調製し、コスミドベクター pAxcw (両端欠失型) の SmaI 部位に挿入し、コスミドベクター pAxCAGFP (45.6kb) を作製した。同様に、GFP 発現単位を含む DNA 断片をコスミドベクター pAxcwit (両端完全型) の SmaI 部位に挿入し、コスミドベクター pAxCAGFPit (45.6kb) を作製した。

#### 【0048】

#### (3) CAG プロモーター下流に任意の遺伝子を挿入するためのコスミドベクターの作製

コスミドベクター pAxCAwt (両端欠失型、図 6 (A)) を BsrGI 及び BstZ17I 消化

し、CAGプロモーターを含む約5.1kbのDNA断片(a)を得た。一方、コスミドベクターpAxcwit (両端完全型、図6(B))をBsrGI及びSrfI消化し、ori及びCOS領域を含む約18kbのDNA断片(b)を得た。また、pAxcwitをBstZ17I及びSrfI消化し、oriを含まない約22kbのDNA断片(c)を得た。(a)(b)(c)の三断片をライゲーションし、コスミドベクターpAxCawtit (45.0kb、図6(C))を作製した。pAxCawtitは、アデノウイルスゲノム両端部分以外は、コスミドベクターpAxCawt (両端欠失型)と同じ構造であり、CAGプロモーターとポリA付加配列との間のSwaI部位またはClaI部位に外来遺伝子を挿入することができるコスミドベクターである。

#### 【0049】

##### 実施例3

—アデノウイルスゲノムの大部分を除いたプラスミドの作製及び挿入遺伝子の発現確認—

##### (1) アデノウイルスゲノムの大部分を除いたプラスミドの作製

実施例2で作製したコスミドベクターpAxCARedEit及びpAxCAGFPitには、CAGプロモーターの上流すぐの所とスパーサー領域内に制限酵素SalI部位ならびにNruI部位が存在するので、コスミドベクターをこれらの制限酵素で消化後自己ライゲーションすることにより、アデノウイルスゲノムの大部分を除いた(左端から約0.4kbは存在する)プラスミドを作製することができる。

まず、pAxCARedEitをSalI消化後、自己ライゲーションさせたDNAで大腸菌DH5 $\alpha$ を形質転換し、アデノウイルスゲノムの大部分及びスパーサー領域を除いたプラスミドpAxCARedEit (6.1kb)を作製した。

同様に、コスミドベクターpAxCAGFPitをSalI消化後自己ライゲーションすることにより、プラスミドpAxCAGFPit (6.2kb)を作製した。

#### 【0050】

##### (2) 赤色蛍光タンパク質の発現確認

コスミドベクターpAxCARedEitにおいて、サンゴ由来赤色蛍光タンパク質 (RedE) の発現単位が正確に組み込まれていることを確認するため、(1)で作製したプラスミドpAxCARedEitで細胞を形質転換し、RedEの発現確認を行った。

まず、血清を含まないダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM培地) 1mlに、プラ

スミドpxCARedEit 3  $\mu$ gとTransFast (登録商標) トランスフェクション試薬 (Promega) 9  $\mu$ lを加え、よく混合後室温で15分放置した。次いで、コラーゲンコート6穴プレートではほぼコンフルエントに培養した293細胞の培地を除き、上記プラスミド/試薬の混合物全量を加え、37℃で1時間培養後、5% FCS添加DMEM培地2mlを加え、16時間培養後培地交換を行い、さらに培養した。形質転換の2日後、蛍光顕微鏡で赤色の蛍光を観察 (励起波長558nm/放射波長583nm) したところ、多数の細胞で赤色の蛍光が認められたことより、コスミドベクターpAxCARedEitはRedE発現単位が正確に組み込まれていることを確認した。

#### 【0051】

##### 実施例4

—コスミドベクター単独での形質転換による組換えアデノウイルスベクターの作製—

実施例2で作製したコスミドベクターpAxCARedE (両端欠失型)、pAxCARedEith (左端完全型)、pAxCARedEit (両端完全型)、pAxCAGFP (両端欠失型)、pAxCAGFPit (両端完全型)を大量に調製し、おのおの30  $\mu$ gを制限酵素Csp45I (TOYOBO)で37℃、2時間消化した。反応液の一部をアガロース電気泳動し、DNAが完全に消化されたことを確認後、反応液をフェノール/クロロホルム抽出し、次いでクロロホルム抽出を2回行った後、エタノール沈殿した。エタノール沈殿後のDNAをTEバッファ60  $\mu$ lに溶解し、その1  $\mu$ lをアガロース電気泳動し、1.5kbのバンドの濃さを濃度既知のDNAのバンドと比較することによりDNA濃度を算定し、形質転換に用いた。

#### 【0052】

まず、血清を含まないダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM培地) 2mlに、Csp45I消化したコスミドDNA 10  $\mu$ gとTransFast (登録商標) トランスフェクション試薬30  $\mu$ lを加え、よく混合後室温で15分放置した。なお、pAxCARedEitについては、Csp45I消化せず、環状のままのコスミドも形質転換に用いた。6cmシャーレにほぼコンフルエントになった293細胞から培地を除き、上記プラスミド/試薬の混合物全量を加え、37℃で1時間培養後、5% FCS添加DMEM培地 (以後単に培地と呼ぶ) 3mlを加え、さらに培養を続けた。16時間後、培地交換を行い、シャーレ



から細胞を剥がし培地11mlに懸濁した。これとは別に、形質転換していない293細胞（6 cmシャーレ）を用意し、細胞を剥がし培地10mlに懸濁した。形質転換した細胞11mlのうち1.1mlを形質転換していない細胞9mlと混合し、コラーゲンコートされた96穴プレート1枚に100  $\mu$  l/ウェルずつ分注した（10倍希釈プレート）。形質転換した残りの細胞も、同様に96穴プレート1枚に100  $\mu$  l/ウェルずつ分注した（1倍希釈プレート）。各々のプレートは5% CO<sub>2</sub>存在下、37℃で培養し、5日後および10日後に培地50  $\mu$  lを添加した。

#### 【0053】

形質転換3日目以降、連日、細胞変性の有無を観察すると共に、RedEの発現単位を搭載したコスミドベクター（pAxCARedE、pAxCARedEith、pAxCARedEit）で形質転換した細胞は、赤色の蛍光を発するRedEタンパク質が発現しているかどうか蛍光顕微鏡で観察した（励起波長558nm/放射波長583nm）。pAxCARedEitで形質転換した細胞では、RedEタンパク質の発現が確認された。ただし、その時期はクローンにより異なり、形質転換5日ないし6日後の比較的早い時期から発現が認められたクローンと、形質転換8日から10日後の比較的遅い時期に初めて発現が認められたクローンが存在した。そこで、前者から5クローン、後者から4クローンを任意に選び、それぞれ細胞変性が完全に起きてから、細胞懸濁液を1.5ml容のマイクロ遠心チューブに回収し、密閉型超音波破碎機で破碎後（200W、30秒 x 3回）、マイクロ遠心機で遠心し（5,000 rpm、5分）、その上清をウイルス液として回収した。

#### 【0054】

一方、コラーゲンコートした24穴プレートにほぼコンフルエントとなった293細胞を用意し、約100  $\mu$  lを残して培地を除き、回収したウイルス液10  $\mu$  lを加え、37℃で1時間、ウイルスを感染させた後、培地0.4mlを加え、37℃で培養した。細胞が完全に変性した3日から4日後に、細胞画分を回収し、100  $\mu$  g/mlのProteinase Kを含むTNEバッファー（50mM Tris-HCl (pH8.0)/100mM NaCl/10mM EDTA）400  $\mu$  lで細胞をよく懸濁後、10% SDS 4  $\mu$  lを添加し、50℃、2時間加温した。次いで、フェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出を各々2回行った後、エタノール沈殿し、沈殿後のDNAを20  $\mu$  g/ml RNaseAを含むTEバッファー50  $\mu$

1に溶解した。最後に、回収したDNAを制限酵素SmaIまたはClaIで消化後、アガロース電気泳動を行い、目的の組換えアデノウイルスが出来ているかどうかを確認した(図7)。

#### 【0055】

図7の下段に制限酵素消化により生じるバンドのサイズを模式的に示したが、目的の組換えアデノウイルスが生成していると、ClaI消化により、ウイルスゲノム左端を含む約0.45kbのバンドと発現単位由来の約1.7kb、0.74kb、0.57kbのバンドが生じる。一方、SmaI消化では、ウイルスゲノム右端を含む0.58kbのバンドが生じる。アガロースゲル電気泳動の写真に示したように、RedEタンパク質の発現が早期に認められた5クローンならびに比較的后期に認められた4クローンとも、ClaI消化及びSmaI消化において、全て予想通りのバンドが生じたことより、本発明の両端完全型のコスミドベクターを用いることにより、ほぼ100%の頻度で目的の組換えアデノウイルスが得られることが示された。

#### 【0056】

次に、両端欠失型(pAxCAREdE)、左端完全型(pAxCAREdEith)、両端完全型(pAxCAREdEit)のコスミドベクターにより得られた組換えアデノウイルスのクローン数を比較した。実験は2回行い、1回目は全てCsp45Iで消化したコスミドDNAを用いて形質転換を行った。両端欠失型コスミド(pAxCAREdE)及び左端完全型コスミド(pAxCAREdEith)では組換えアデノウイルスは全く得られなかったが、両端完全型コスミド(pAxCAREdEit)では、コスミドDNA 10 $\mu$ g当たり340クローンと十分な数の組換えアデノウイルスが得られた(表1)。実験2では、両端完全型コスミド(pAxCAREdEit)をCsp45I消化せず環状のまま形質転換する群も加えたが、Csp45I消化しない場合は組換えアデノウイルスは全く得られなかったことより、両端完全型コスミドを制限酵素消化しアデノウイルスゲノム部分を直鎖状にしてから形質転換する必要があることが示された(表1)。

#### 【0057】

さらに、他の遺伝子(GFP)を挿入したコスミドベクターを用いて検討を行った。両端欠失型コスミド(pAxCAGFP)または両端完全型コスミド(pAxCAGFPit) 10 $\mu$ gを、前述したTransFast(登録商標)トランスフェクション試薬またはCell

Phectトランスフェクションキット (Amersham-Pharmacia社) を用いて293細胞を形質転換した。pAxCARedEitの場合と同様の操作で、形質転換細胞を希釈して96穴プレートにまき替え、生じた組換えアデノウイルスクローン数を計測した。結果を表1に示したが、両端欠失型コスミドで形質転換を行った場合には組換えアデノウイルスは全く得られず、両端完全型コスミドで形質転換した場合のみ、コスミドDNA 10 $\mu$ g当たり50ないし80クローンと十分な数の組換えアデノウイルスが得られた。さらに、このうち10クローンを、pAxCARedEitの場合と同様、ゲノムDNAの制限酵素消化により、生じたクローンのアデノウイルスゲノム構造を解析した。データは省略するが、全てのクローンが目的の組換えアデノウイルスであることが確認できた。

以上の結果より、本発明の両端完全型コスミドベクターは、所望の遺伝子を搭載した組換えアデノウイルスベクターを効率良く作製できることが示された。

【0058】

【表1】

クローン化ゲノム導入法における各種コスミドベクターの組換えアデノウイルス生成効率の比較

cDNA	コスミド	トランスフェクション試薬	ウイルスクローン数(/10 $\mu$ g DNA)	
			実験1	実験2
RedE	両端欠失型 (pAxCARedE)	TransFast <sup>TM</sup>	0	0
	左端完全型 (pAxCARedEith)	TransFast <sup>TM</sup>	0	1
	両端完全型 (pAxCARedEit)	TransFast <sup>TM</sup>	340	190
	両端完全型 (uncut)	TransFast <sup>TM</sup>	ND	0
GFP	両端欠失型 (pAxCAGFP)	TransFast <sup>TM</sup>	0	
		CellPhect	0	
	両端完全型 (pAxCAGFPit)	TransFast <sup>TM</sup>	50	
		CellPhect	80	

RedE: サンゴ由来赤色蛍光タンパク質

GFP: クラゲ由来緑色蛍光タンパク質

ND: 未実施

## 【0059】

## 実施例 5

## —COS-TPC法による組換えアデノウイルスベクターの作製—

両端完全型コスミドベクターが、末端タンパク質付きアデノウイルスゲノムDNA (DNA-TPC) とコスミドベクターとの相同組換え法 (COS-TPC法) にも適用できることを確認するため、以下の実験を行った。

## 【0060】

DNA-TPCは市販の組換えアデノウイルス作製キット (Adenovirus Expression Vector Kit、タカラバイオ社、#6150) に添付されているDNA-TPCを用いた。両端欠失型コスミド (pAxCARedE) または両端完全型コスミド (pAxCARedEit) 8 $\mu$ gとキット添付の制限酵素処理済DNA-TPC 5 $\mu$ lとを、TransFast (登録商標) トランスフェクション試薬またはCellPfectトランスフェクションキットを用いて、実施例 4 に示した方法で293細胞を形質転換し、翌日に細胞を96穴プレートにまき替え、細胞変性が生じたウェル数より、生成した組換えアデノウイルス数を計算した。結果を表 2 に示す。両端完全型コスミドを用いた場合でも、従来の両端欠失型コスミドを用いた場合とほぼ同数の組換えアデノウイルスが得られたことより、本発明の両端完全型コスミドはCOS-TPC法による組換えアデノウイルスベクター作製にも使用できることが確認された。

## 【0061】

なお、COS-TPCを用いたにもかかわらず、生成した組換えアデノウイルス数はコスミド単独で形質転換した場合 (表 1) と差は無かった。本発明者らによるCOS-TPC法のこれまでの実績では、コスミドDNA 10 $\mu$ g当たり、約1000クロンの組換えアデノウイルスが生成する (Miyake S. et. Al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, 1320-1324. (1996)) ので、原因は不明であるが、コスミド単独で形質転換した場合と差が無かったのは、今回のCOS-TPC法での組換えアデノウイルス生成効率が低かったためと考えられる。

## 【0062】

【表 2】

COS-TPC法での組換えアデノウイルス生成効率

コスミド	トランスフェクション試薬	ウイルスクローン数 (/10 $\mu$ g DNA)
両端欠失型 (pAxCARedE)	TransFast™	220
	CellPfect	250
両端完全型 (pAxCARedEit)	TransFast™	190
	CellPfect	330

【0063】

## 【発明の効果】

本発明により、組換えアデノウイルスベクターの作製に有効に用いられる新規コスミドベクターなどが提供される。本発明の新規コスミドベクターは、COS-TPC法、完全長クローン化ゲノム導入法の両方に応用可能であり、かつ簡便で実用性の高いコスミドベクターであることから、組換えアデノウイルスベクターの作製において有効に利用することができる。

【0064】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Saito, Izumu

Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.

&lt;120&gt; Novel Cosmid Vector

&lt;130&gt; 133112

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1



<210> 1

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
oligonucleotide

<400> 1

gatccgcatg catcatcaat aatatacctt attttggatt gaag

44

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
oligonucleotide

<400> 2

cttcaatcca aaataaggta tattattcat gatgcatgcg

40

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、本発明のコスミドベクターを用いた組換えアデノウイルス作製法の概



念図である。図中、DNA-TPCは末端タンパク質が付いた状態のアデノウイルスゲノムDNAを、Ad5はヒトアデノウイルス5型ゲノムを、Ap<sup>r</sup>はアンピシリン耐性遺伝子を、oriは大腸菌複製オリジンを、COSはCOS領域を示す。また、DNA-TPCに記載された太い矢印は制限酵素EcoT22I認識部位の位置を示す。

Aに示したCOS-TPC法では、制限酵素消化していないコスミドベクターと制限酵素消化したDNA-TPCとで細胞を形質転換し組換えアデノウイルスを作製する。

Bに示したクローン化ゲノム導入法では、コスミドベクターを制限酵素Csp45Iで消化後、細胞を形質転換し組換えアデノウイルスを作製する。

#### 【図2】

図2は、本発明に用いたコスミドベクターの構造の概念図である。図中、CAGはCAGプロモーターを、GpAは $\beta$ -グロビンポリA付加配列を示す。

#### 【図3】

図3は、本発明のコスミドベクターの構築法を示す模式図である。図中、 $\Psi$ はアデノウイルスパッケージングシグナルを、ITRは逆方向反復配列を示す。また、プラスミドやコスミド名の前の(A)から(K)の識別記号は、図3から図5で共通である。

#### 【図4】

図4は、本発明のコスミドベクターの構築法を示す模式図である。

#### 【図5】

図5は、本発明のコスミドベクターの構築法を示す模式図である。

#### 【図6】

図6は、コスミドベクターpAxCAwt（両端欠失型）、pAxcwit（両端完全型）およびpAxCAwtit（両端完全型）の構造を示す模式図である。

#### 【図7】

図7は、コスミドベクターpAxCARedEitで形質転換した細胞から生じた組換えアデノウイルスの構造を確認した実験結果である。形質転換5日ないし6日後にRedEタンパク質の発現が確認されたクローン（早期発現）から5クローンを、形質転換8日から10日後にRedEタンパク質の発現が確認されたクローン（後期発現）から4クローンを選び、ウイルスゲノムDNAをSmaIまたはClaI消化し解析し



た。

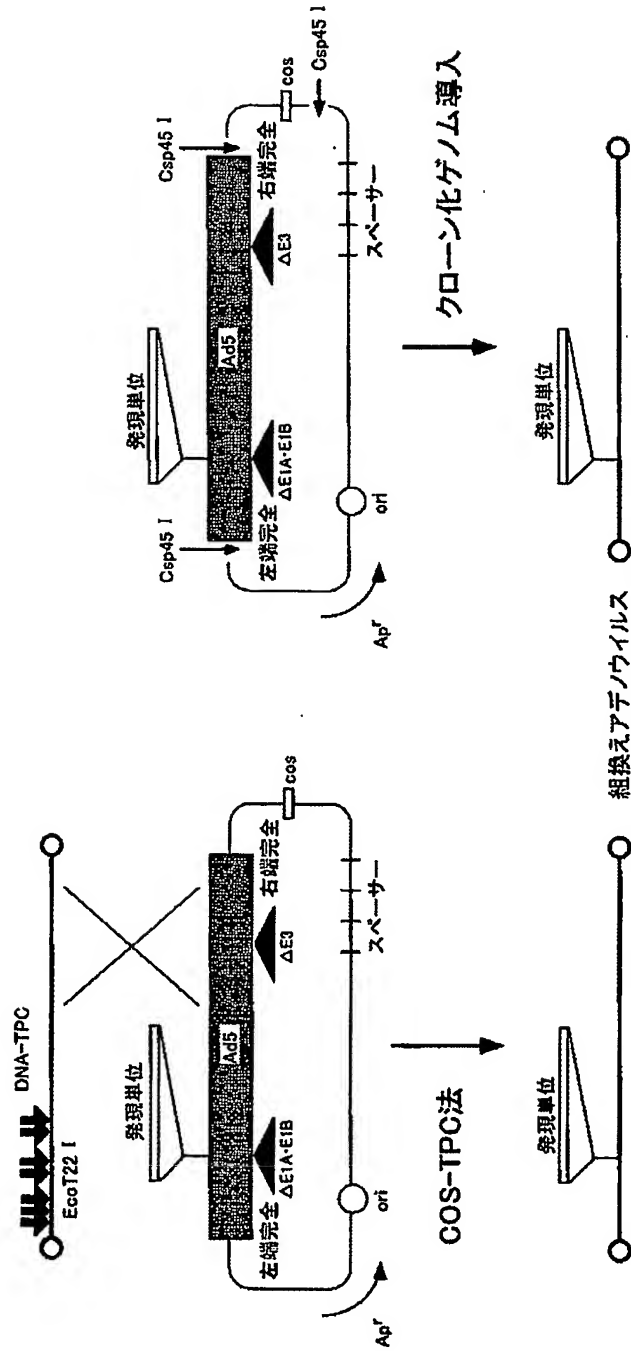
上左図はSmaI消化、上右図はCla消化したDNAのアガロース電気泳動の結果である。図中、ゲル上の数字はクローン番号を示す。下図は、生じた組換えアデノウイルスゲノム上での各制限酵素認識部位の位置ならびに制限酵素消化断片のサイズを模式的に示したものである。矢印の上の数値が、ゲノム左端を1番とした場合の各制限酵素部位の塩基番号、線下の数値が制限酵素消化断片のサイズ (kb) を示す。



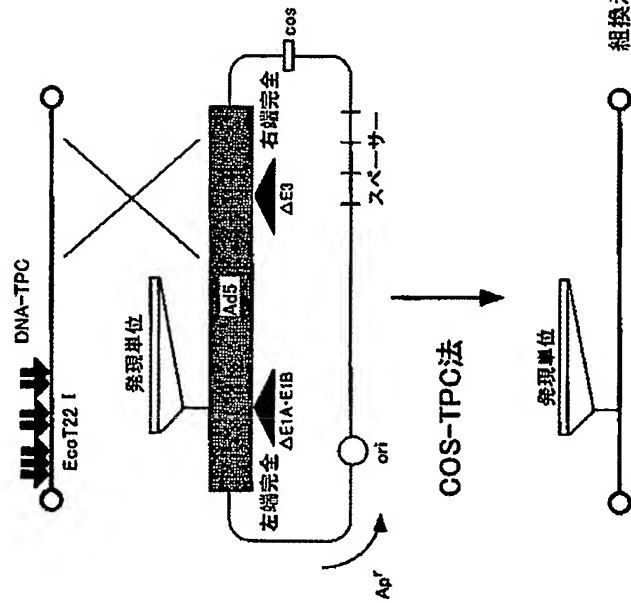
【書類名】 図面

【図1】

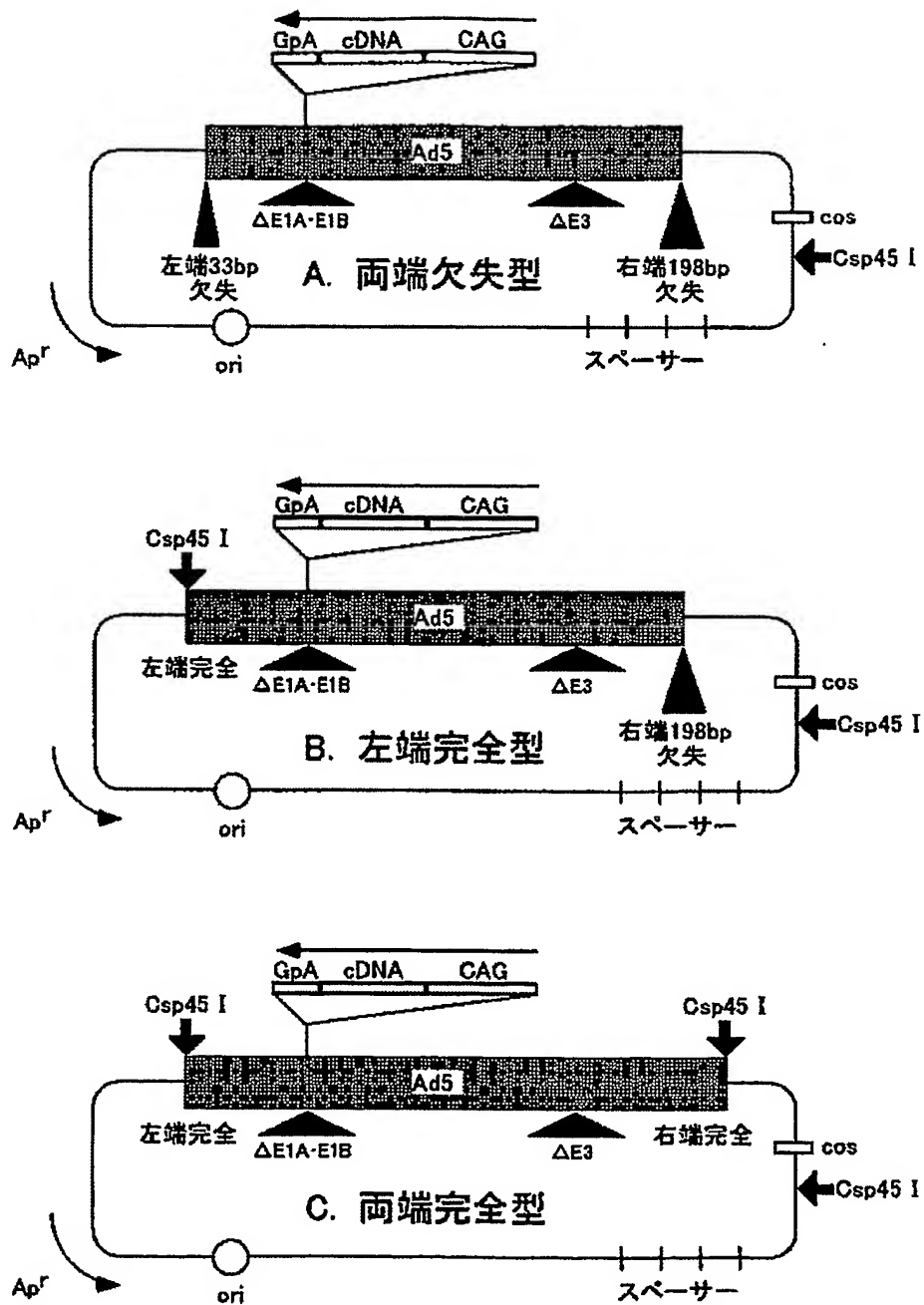
B. クローニン化ゲノム導入法



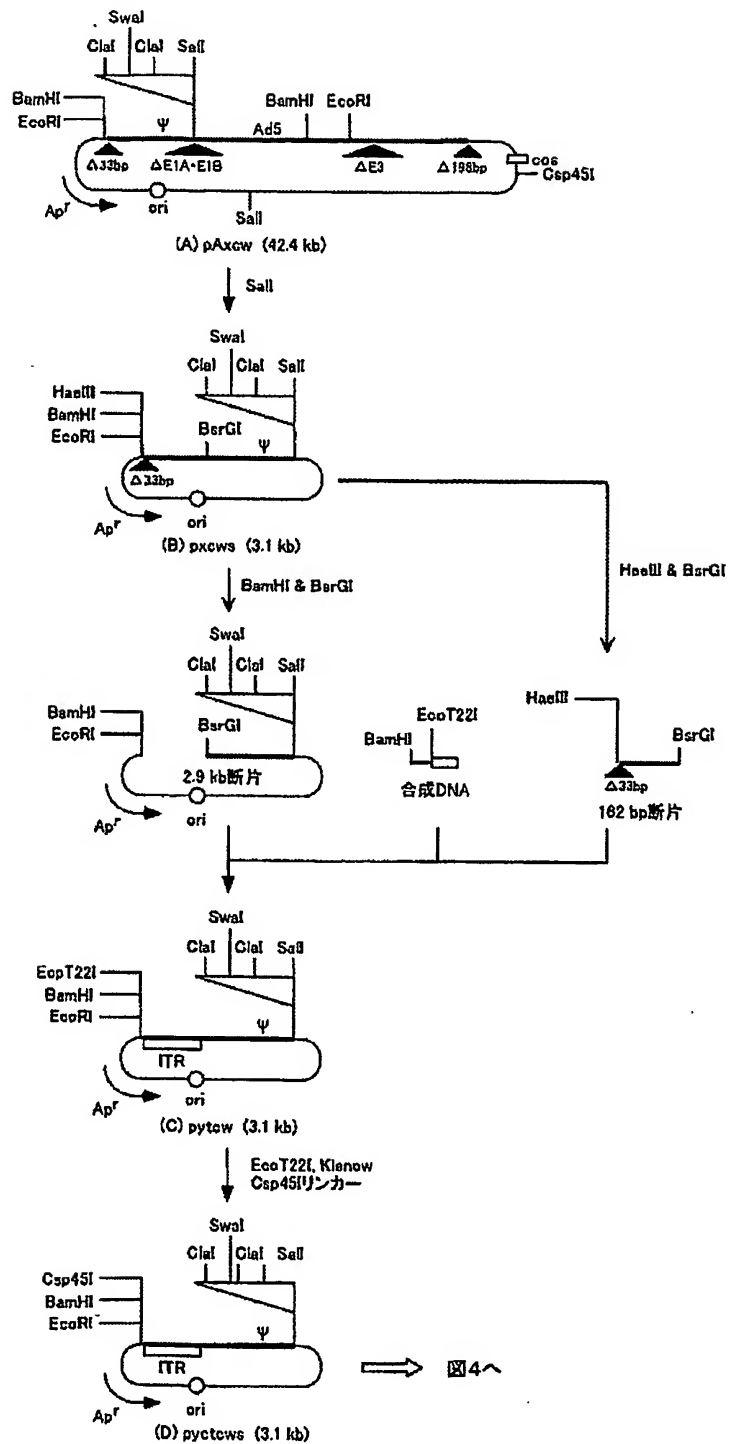
A. COS-TPC法



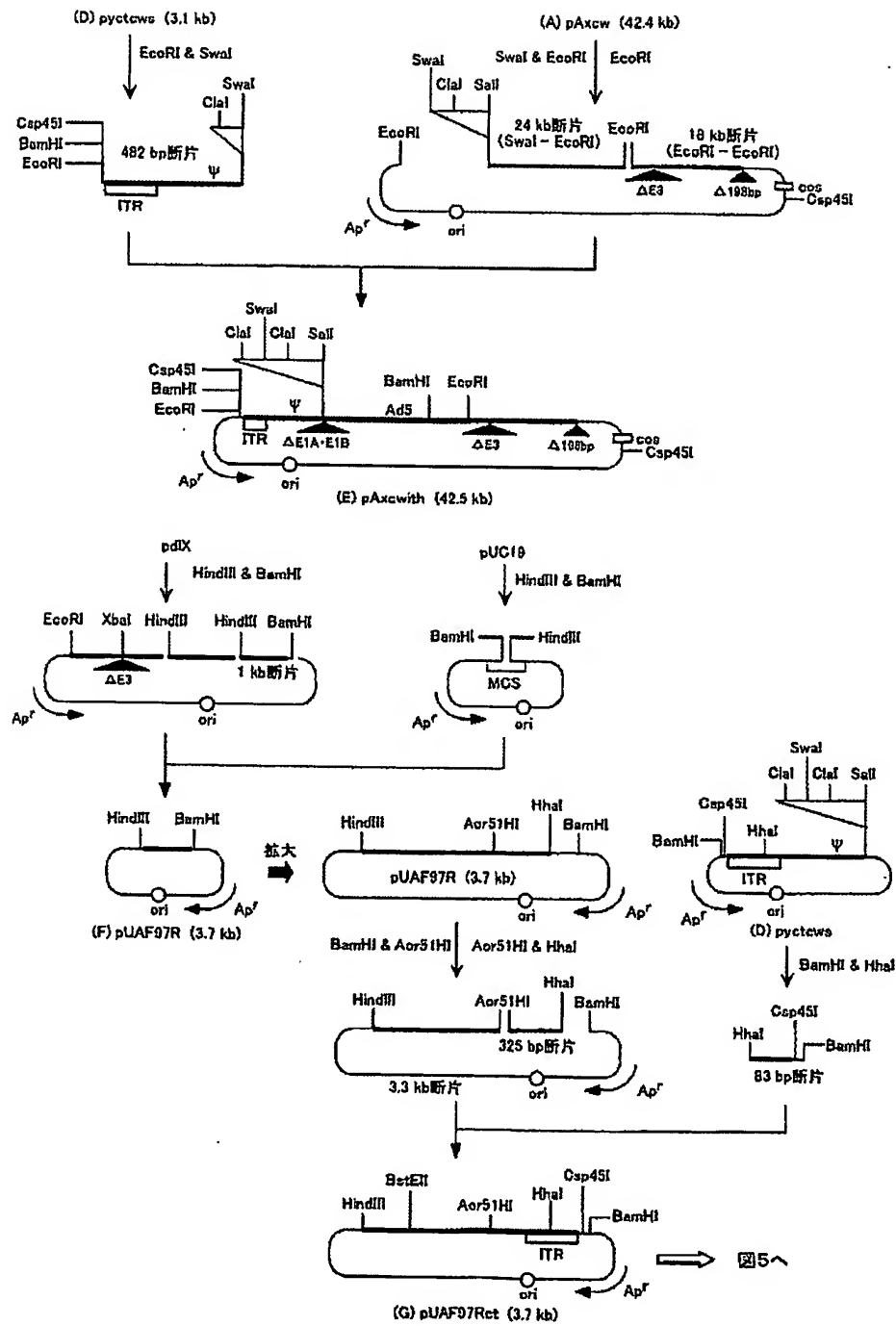
【図 2】



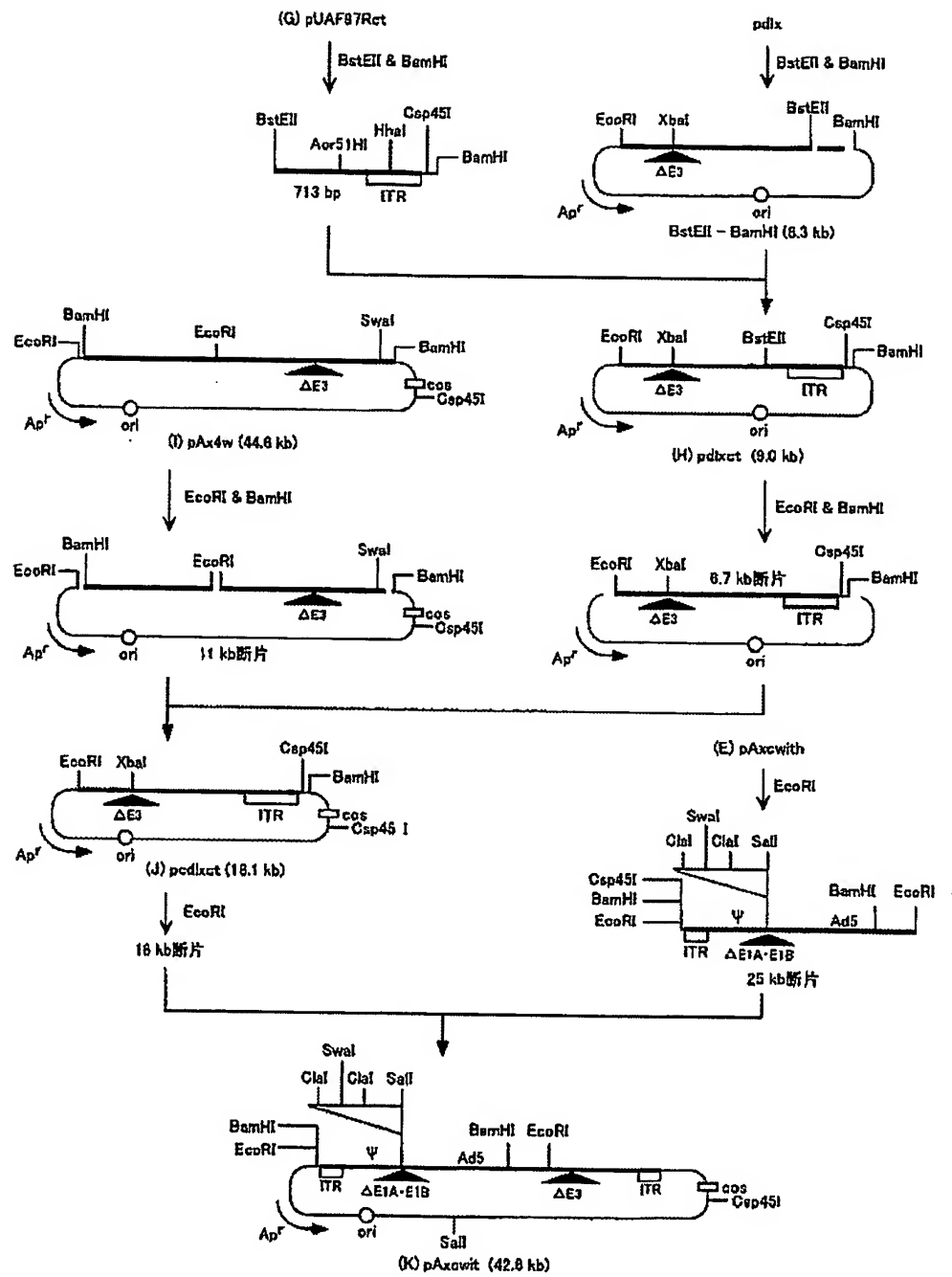
【図 3】



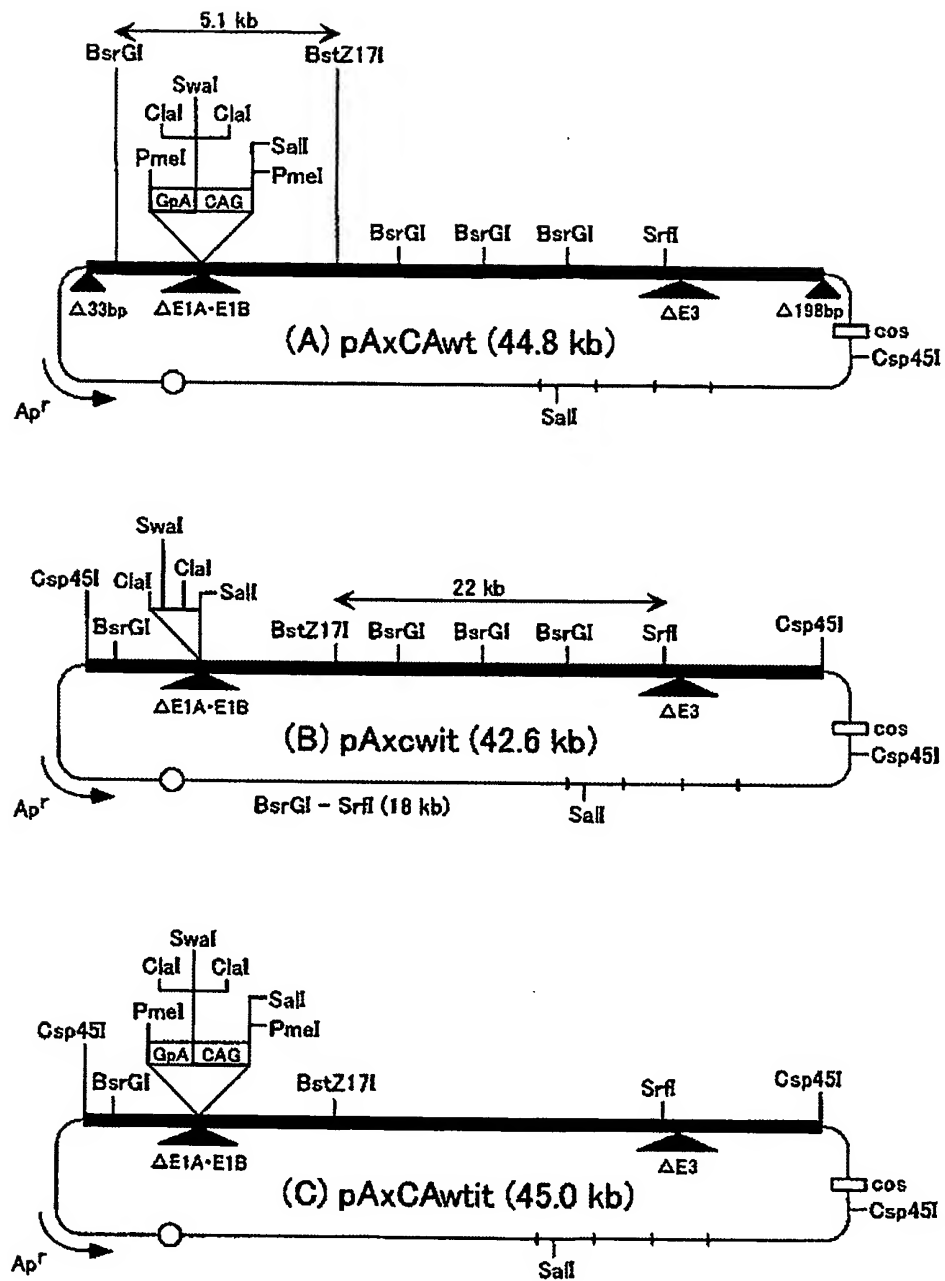
【図 4】



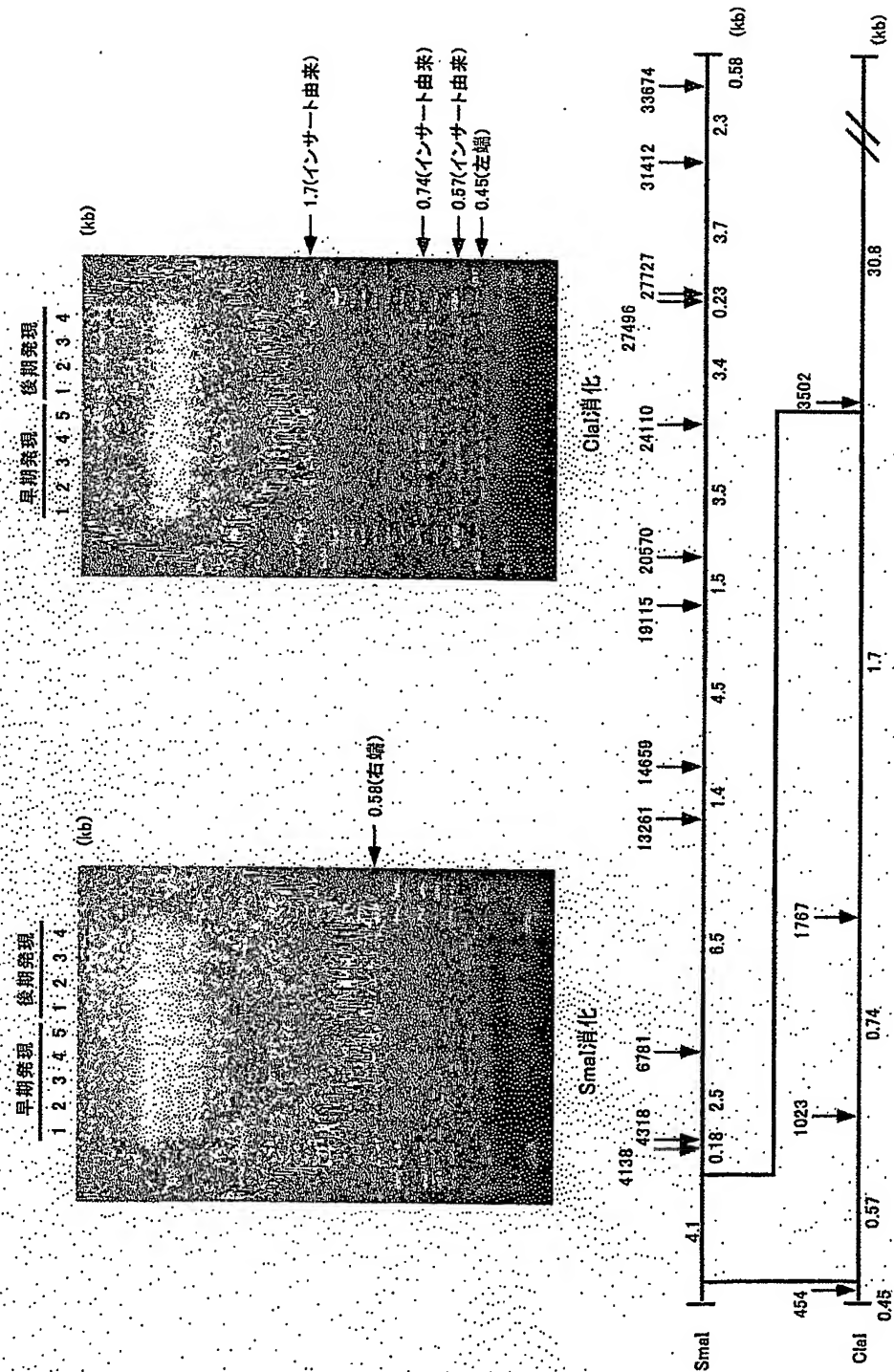
【図 5】



【図 6】



【図7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 組換えアデノウイルスベクターの作製に有効に用いられる新規コスミドベクター等を提供すること。

【解決手段】 以下の(1)～(3): (1)完全な塩基配列のアデノウイルス逆方向反復配列を含むアデノウイルスゲノムを含有する、(2)アデノウイルスE1遺伝子領域を欠失している、(3)アデノウイルスゲノムの両側に該アデノウイルスゲノム中には存在しない制限酵素認識配列を有する、という特徴を有するコスミドベクター、該コスミドベクターを利用した組換えアデノウイルスベクターの作製方法、前記コスミドベクターを成分として含有する組換えアデノウイルスベクター作製用試薬。

【選択図】 なし





認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-113578
受付番号	50300643221
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 6月16日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 4月18日
-------	-------------

次頁無



特願 2003-113578

出願人履歴情報

識別番号

[502415124]

1. 変更新月日

2002年11月15日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都港区白金台4-2-10-1001

氏 名

斎藤 泉



特願 2003-113578

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[000183370]

1. 変更年月日

1990年 8月 9日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

氏 名

住友製薬株式会社